

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22591999

研究課題名（和文）

神経血管柄付き筋肉移植におけるアセチルコリンレセプターの動向に関する研究

研究課題名（英文）

Experimental study of free muscle transplantation with microneurovascular anastomosis -Analysis of acetylcholine receptor in transplanted muscle-

研究代表者

柏 克彦 (KASHIWA KATSUHIKO)

岩手医科大学・形成外科学講座・教授

研究者番号：70169423

研究成果の概要（和文）：

白色家兎の神経血管柄付き大腿直筋長頭移植モデルの筋性状、筋体重量、H-EやAzan等の染色による組織学所見、蛍光染色による筋体内アセチルコリンレセプターの解析を経時的に試みた。

神経切断モデルでは筋委縮の経時的進行が、神経切断再縫合モデルでは術直後の萎縮と8週間よりの再生が確認された。筋性状・重量、一般染色における筋組織の萎縮、再生の程度は筋肉内CATの経時的変化と一致したが、レセプターの描出は不安定で数量的解析に至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

Experimental study using the rectus femoris muscle of rabbits was performed to investigate the recovery process of the muscle transplantation with microneurovascular anastomosis.

After 2~24 postoperative weeks, tissue specimens obtained from muscle tissue were examined for pathological analysis. In the pathological analysis, fluorescent staining was used for visualizing the muscle fibers and distribution of acetylcholine receptors together with H-E staining and Azan staining.

Wet weight of transplanted muscle had gradually increased after it decreased to about half of control model in innervation model. Degeneration and recovery of muscle fibers were confirmed by H-E and Azan staining in the each model, although the comfortable result for statistical analysis could not be obtained in the fluorescent staining, because the determination of the distribution of acetylcholine receptor was unstable.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,500,000	450,000	1,950,000
23年度	700,000	210,000	910,000
24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：マイクロサージェリー学、筋肉移植、神経再生、アセチルコリン、レセプター、アセチルコリンレセプター

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

①1960年 Jacobson らが、イヌおよび家兎の微小血管吻合を顕微鏡下に行き、微小血管吻合を用いた組織移植が実験的・臨床的に行われるようになり、現在、形成・再建外科領域では、遊離皮弁、筋皮弁、骨付き皮弁等の遊離組織移植が広く用いられている。これら顕微鏡下に行う遊離組織移植の中で、神経血管柄付き遊離筋肉移植は支配神経の縫合を伴う血流を有する状態での筋肉移植法であり、移植後の神経筋複合体の再生に基づく筋機能の回復を力源とする動的再建の一手法として認められ、顔面神経麻痺や四肢筋機能麻痺などに対する動的再建法として応用されるに至っている。その基盤として、筋移植時の筋組織の回復過程に関し、多くの基礎的研究が行われてきたが、神経筋接合部レベルでの回復過程について述べた報告は少ない。

当教室の本庄は、家兎の大腿直筋を用いた移植筋モデルを作成し、creatine kinase 活性とその isozyme の経時変化を生化学的に検討し報告している（本庄省五：微小吻合法による筋肉移植の実験的研究。日本形成外科学会誌 8：784-797, 1988）。これに加え、我々は、微小縫合法による筋移植後の再神経支配と筋組織の回復過程との関連を解明する目的で、白色家兎を用いた同様の神経血管柄付き筋肉移植モデルを作成した上で、神経筋接合部の伝達物質であるアセチルコリン生成に関与する酵素で、支配神経損傷後の筋肉組織の回復の指標となりうるということが知られている choline acetyltransferase (CAT) 活性の経時変化について検討した。その結果、CAT 活性の変化は切断後に神経の再縫合を行ったモデルにおいて、術直後はいったん減少するものの、術後4~6週を境に増加に転じ、移植筋への再神経支配の指標となりうるということが確認できている（図1：柏克彦：微小血管神経縫合法による筋肉移植の実験的研究 - 移植筋の choline acetyltransferase 活性の経時変化について-。日本形成外科学会誌 15、215-229、1995。より引用）。

以上の実験結果は、移植筋機能に関する従来の研究結果と矛盾しないものであったが、同一移植筋体内での部位による位相差や、神経再生と筋機能回復までのタイムラグなど、筋の機能的回復過程には研究の余地が残されているものと考えられた。CAT は神経筋接合部の伝達物質を生成する酵素であり、いわば接合部における神経側の回復を反映するものとも考えられる。実際、支配神経束と移植筋の回復には部位により位相差が見られるとの報告もあり、これまでの実験結果のみから本

酵素の回復が直接筋の機能的回復過程を反映するものと明言することはできない。一方で、移植筋体内に存在するアセチルコリンレセプターは、神経伝達物質の受容体であり、いわば神経筋接合部の筋側側の構造物といえることができ、本受容体の回復は直接筋機能の回復に結びついている可能性を有する。

筋移植後の本受容体の分布と数量的変化を研究し、既存の研究成果と比較することは、移植筋の機能的修復が行われる過程を明らかにする上で重要と考えられた。

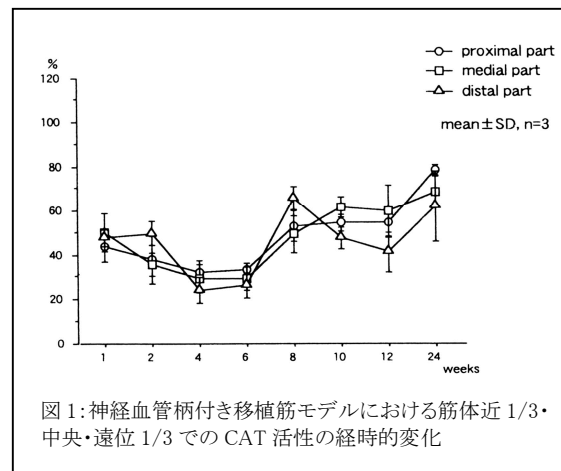


図1: 神経血管柄付き移植筋モデルにおける筋体近1/3・中央・遠位1/3でのCAT活性の経時変化

近年形成外科領域では、神経端側縫合に関する報告が相次いでいる。本法は、1873年、Letievantにより考案された手技であり、1994年のViterboの臨床報告により、神経修復に対する有用性が大きく注目された。腫瘍切除後の神経欠損の修復などに応用されつつあるが、その神経再生過程や回復の程度には不明な点も多い。アセチルコリンレセプターの変化が、神経筋接合部の修復過程を示すものであれば、その量的変化は筋機能回復の指標となりうるものと考えられ、従来の神経端縫合と端側縫合の比較など、神経再建手技の有用性の判定材料のひとつとなりうる可能性があると思われた。

以上の背景から、移植筋モデルにおけるアセチルコリンレセプターの経時変化の解析を主体とする研究には、基礎的、臨床的な有益性があるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物実験における移植筋体内のアセチルコリンレセプターの描出法を確立することで、これと筋組織の肉眼的、組織的経時変化を観察、比較することにより、再建外科領域で動的再建に用いられている血管神経柄付き筋肉移植における筋機能の

修復過程を、神経筋接合部の組織変化の立場から明らかにすることであった。最終的には、移植筋回復過程における筋肉組織の継時的変化と筋体内アセチルコリンレセプター分布・量の変化の比較から、本レセプターが筋の機能的回復の指標となりうるかを検討し、支配神経の修復過程と筋機能回復との関連づけを行うことを最終目標とした。

### 3. 研究の方法

以上の目的を踏まえ、実験には成熟雄白色家兔(体重2.5~3.0kg)の大腿直筋短頭を用いた。栄養動静脈、支配神経のみを残して筋体を剥離し、膝蓋腱付着部を切断遊離した後、以下の2群のモデルを作成した：

(A) 神経切除モデル；支配神経のみ筋体刺入部中枢で切離する(実際には神経断端間の自然再生を避けるため、約1cmにわたり切除し、断端は焼却した)、

(B) 神経切断再縫合モデル；支配神経を筋体刺入部中枢で一旦切断した後、手術用顕微鏡下に10-0ナイロン糸を用いて神経外膜縫合による再縫合を行った。

何れのモデルも神経への操作終了後は、筋体を定位に戻して縫合固定し、洗浄した後、創を縫合閉鎖した(図2)。

術後は飼育ゲージ内で通常と同様の状態での管理を行い、患肢に対する固定は特には行わなかった。

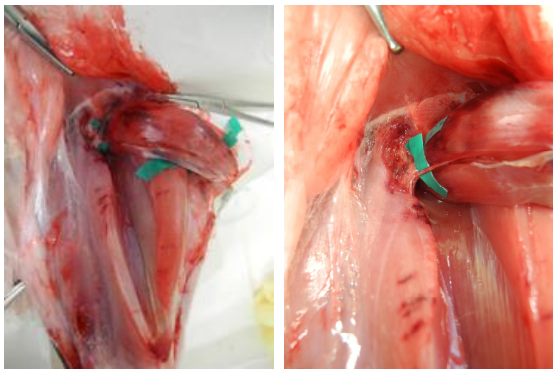


図2；実験モデルの作成(神経切断、再縫合モデルの支配神経縫合後の所見)：

神経刺激装置を用いて支配神経を同定後、切離し、顕微鏡下に10-0ナイロン糸によるEpineural sutureを用いて再吻合を行った。

(神経切断モデルでは、切断部で神経を切除し、断端を焼却した。)

これら2群について術後2~24週に、静脈麻酔過量投与による殺の後、大腿直筋短頭筋体を採取し標本とした。

筋体外観の肉眼的観察と重量測定の後、検

体を細分し、①一般染色用の10%ホルマリンによる固定、②免疫染色にもちいる凍結標本のPBS-ホルマリン固定を行った。

①の検体を用いてパラフィン切片を作成し、H-E染色ならびにアザン染色を行った。光学顕微鏡下に筋肉組織の変性や萎縮、回復の状況の確認を行った。

また②の標本を用いて凍結切片を作成し、蛍光染色法によるアセチルコリンレセプターの観察を試みた。染色試薬としては $\alpha$ -Bungarotoxin-tetramethylrhodamine (Sigma-Aldrich, Co.)溶液を用いた。本法はAndersonらに従ったものであるが(Anderson M. J. and Cohen M. W.; Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. J Physiol. 237, pp385-400, 1974)、筋肉線維との関連性をより明確化する目的でAlexa Fluora® 488 phalloidin (Invitrogen, Co.)溶液による染色も追加した二重染色を行った。

以上により作成したプレパラートを、レーザー共焦点顕微鏡LSM510(カールツァイス社)を用いて観察した。得られた画像はパーソナルコンピュータに取り込み、解析に供した。

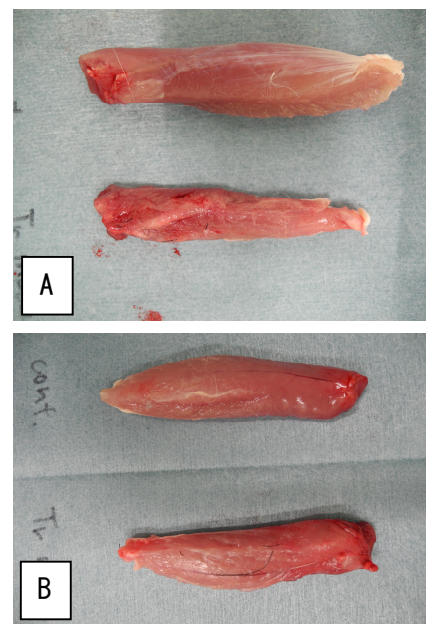


図3；各モデルの所見

A. 神経切除モデルの健側(上)ならびに患側(下)の筋体を示す。

B. 神経切断再縫合モデルの支配神経再生後の健側(上)ならびに患側(下)の筋体を示す。

神経切除モデルでは、コントロールならびに神経切断再縫合モデルと比較し、色調の相違と著明な筋体の萎縮が認められた。

#### 4. 研究成果

結果として、移植モデルでの筋体の肉眼的性状ならびに重量は、神経切除モデルにおいては筋体の黄褐色～灰白色への色調変化、ボリュームの減少などの萎縮性変化が経時的に進行し、最終的に筋体重量はコントロールの約40%に減少した(図3)。

これに対して神経切断再縫合モデルでは一旦肉眼的に萎縮性変化を呈し、重量・容量も減少するが、後に回復が認められ、筋体の重量は、術後6～8週でコントロールの約6割に減少した後増加に転じ、最終的に9割程度にまで回復することが確認された。

H-E染色ならびにアザン染色を用いた組織学的検索においては、コントロールとした健側筋での正常筋線維に対し、神経切除モデルでは、経時的持続的な筋線維の萎縮と線維組織の増加を認めるのに対し、神経切断再縫合モデルは一旦萎縮性変化を呈した後、術後6～8週で回復に転じた(図4-6)。

一方、 $\alpha$ -Bungarotoxin-tetramethylrhodamine溶液とAlexa Fluora® 488 phalloidin溶液を用いた直接蛍光二重染色による観察において、筋体内アセチルコリンレセプターは緑色に発光する筋組織内の蛍光領域の散在という形で認められる。しかし、今回の実験を進める中で、本染色法によるアセチルコリンレセプターの描出には不安定性が認められた。

その理由の一つとして、本実験における検体作成が微細な臨床的手技であることが挙げ

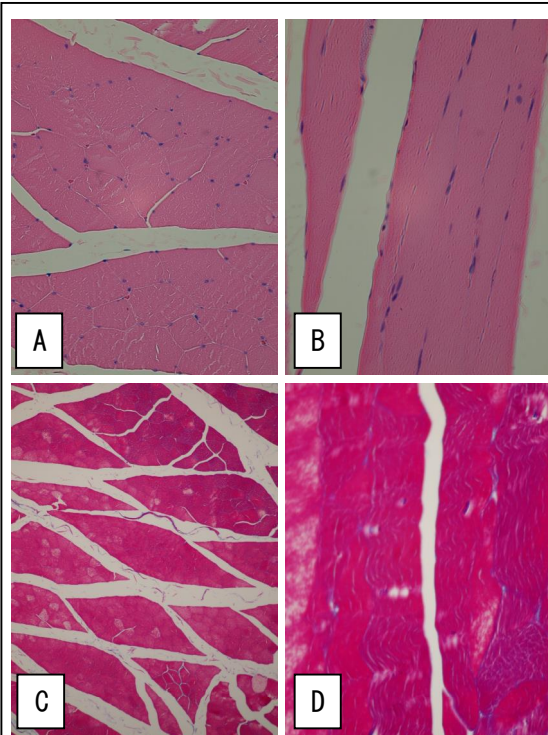


図4: コントロールモデルの組織所見 (A, B H-E 染色 C, D Azan 染色)

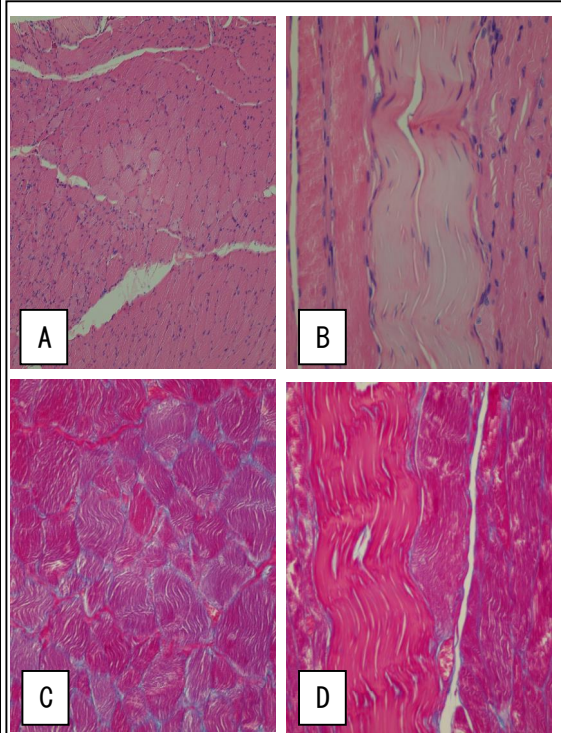


図5: 神経切断モデル術後16週の組織所見 (A, B H-E 染色 C, D Azan 染色)

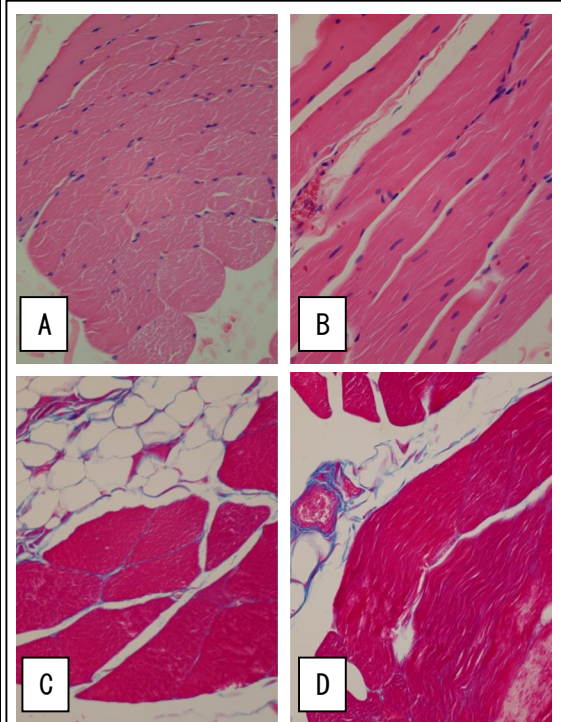


図6: 神経切断再縫合モデル術後16週の組織所見 (A, B H-E 染色 C, D Azan 染色)

られる。すなわち、神経回復状況の個体差による影響が存在する可能性が示唆された。

しかし一方では、検体作成における固定時

間や染色手技の多少の差異がその原因となっている可能性も考えられた。このため、アセチルコリンレセプター分布の変化についての数量的解析に関しては十分な結論を得るには至っていない。

以上の如く、本法を用いたアセチルコリンレセプターの描出は、現段階では移植筋回復過程の臨床的な評価法としては用いがたく、今後の課題として、検体数を増やしてゆくとともに、アセチルコリンレセプターの安定した描出と数量的解析を図る必要があるものと考えられた。現在、本蛍光染色についてのプロトコルを調整してさらなる検討を進めてゆく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

本研究の成果は、さらなる検討を加えた上で、第23回日本形成外科学会基礎学術集会において報告する予定である。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏 克彦 (KASHIWA KATSUHIKO)

岩手医科大学・形成外科学講座・教授

研究者番号：70169423

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

安岡智之 (YASUOKA TOMOYUKI)

岩手医科大学・形成外科学講座・助教

研究者番号：10382607

遠野久幸 (TONO HISAYUKI)

岩手医科大学・形成外科学講座・任期付助教

研究者番号：10509003

黒田敬

岩手医科大学・形成外科学講座・研究員

研究者番号：30530224